

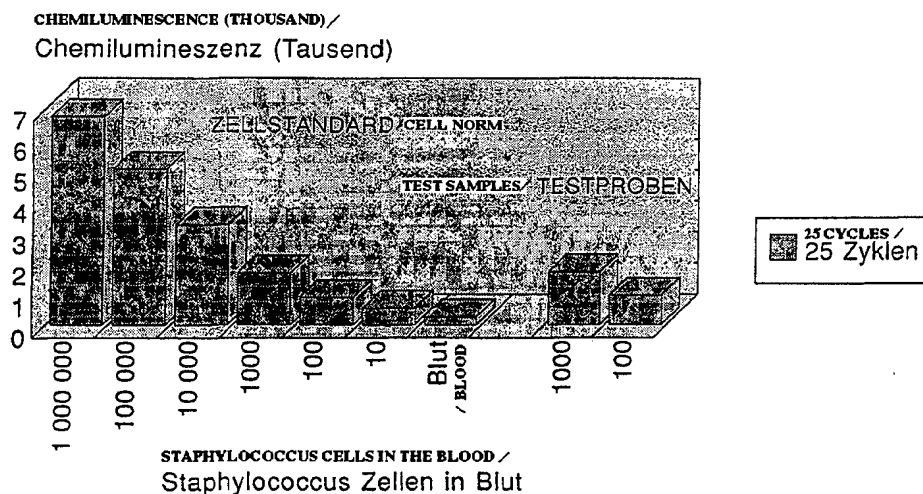
**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/13395</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 18. Mai 1995 (18.05.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP94/03553  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Oktober 1994 (28.10.94)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 38 119.7 8. November 1993 (08.11.93) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SPRINGER, Wolfgang [DE/DE]; Katernberger Schulweg 31, D-42113 Wuppertal (DE). ENDERMANN, Rainer [DE/DE]; In den Birken 152a, D-42113 Wuppertal (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BAYER AKTIENGE- SELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, LT, SI, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>

**(54) Title:** SPECIFIC GENE PROBES AND METHODS FOR QUANTITATIVE DETECTION OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI

**(54) Bezeichnung:** SPEZIFISCHE GENSONDEN UND VERFAHREN ZUM QUANTITATIVEN NACHWEIS VON METHICILLINRESISTENTEN STAPHYLOCOCCEN



**(57) Abstract**

The invention describes new gene probes and methods for quantitative determination of methicillin-resistant staphylococci.

**(57) Zusammenfassung**

In der Erfindung werden neue Gensonden und Verfahren zum quantitativen Nachweis von methicillinresistenten Staphylococcen beschrieben.

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Spezifische Gensonden und Verfahren zum quantitativen Nachweis von methicillinresistenten Staphylococcen**

- Seit Mitte der siebziger Jahre nahm der Anteil an methicillinresistenten Stämmen bei Staphylococceninfektionen von wenigen Prozenten bis auf 70 % deutlich zu. Während das Auftreten dieser Stämme zunächst nur auf große Universitätskliniken beschränkt war, findet man heute diese resistenten Stämme auch immer häufiger in Krankenhäusern der Grundversorgung (Paul et al., Abstr. 23 ICAAC (1991)).
- Methicillinresistente Staphylococcen sind wichtige nosokomiale Erreger. Sie sind verantwortlich für schwere postoperative Wundinfektionen, Bakteriämien und Infektionen, die von in den Körper eingebrachten Fremdmaterialien, z.B. Kathedern, ausgehen.
- Von besonderer klinischer Bedeutung sind methicillinresistente Staphylococcus aureus (MRSA) und Staphylococcus epidermidis (MRSE) während Staphylococcus hämolyticus Infektionen nur gelegentlich auftreten.
- MRSA/MRSE sind gegen alle  $\beta$ -Laktamantibiotika, wie Penicilline, Cephalosporine, Peneme und Carbapeneme resistent. 80 % der MRSA/MRSE Stämme besitzen auch Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen wie Makrolide, Aminoglykoside und Chinolone.
- Es ist deshalb besonders wichtig möglichst frühzeitig eine Therapie mit dem wirksamen Antibiotikum einzuleiten. Die Alternativen für die Therapie von Infektionen mit methicillinresistenten Staphylococcen sind auf wenige Antibiotika beschränkt. Vankomycin ist das Antibiotikum der Wahl. Ein anderes Glycopeptidantibiotikum, Teicoplanin, wurde kürzlich erst eingeführt. Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Kombination von Antibiotika wie Ciprofloxacin mit Rifampicin.

Die klassische Diagnostik der MRSA/MRSE ist zeit- und arbeitsaufwendig und erfordert die in vitro Kultivierung der Stämme auf Platten mit anschließender physiologischer Identifizierung mit Hilfe von Testsystemen wie z.B. "api staph" (BioMérieux) und Bestimmung der Antibiotikaresistenzen durch Reihenverdünnungsteste (MHK-Werte) oder Agardiffusionsteste (Hemmhofteste).

Methicillinresistente Staphylococcen besitzen im Gegensatz zu den in sensitiven Stämmen vorhandenen Penicillin Bindeprotein-Genen ein zusätzliches sogenanntes mec A Gen, das für das Penicillin-Bindeprotein PBP2a codiert. Dieses PBP2a hat eine äußerst geringe Affinität für alle  $\beta$ -Lactamantibiotika und ermöglicht deshalb als Transpeptidase die Zellwandsynthese in Gegenwart von  $\beta$ -Lactamkonzentrationen, die alle anderen PBPs inhibieren (Neu, Science 257, 1064 (1992)).

Da dieses mec A Gen in allen Methicillin-resistenten Staphylococcen vorhanden ist und die Homologie zwischen den verschiedenen mec A Genen sehr hoch ist, bot es sich an auf der Basis dieses Gens eine DNA-Schnell-Diagnostik mit spezifischen Gensonden kombiniert mit bekannten DNA- oder RNA-Applikationsverfahren zu entwickeln.

Die vorliegende Erfindung beschreibt spezifische Oligonukleotid- und Polynukleotidsonden und ihre Verwendung zum schnellen Nachweis von methicillinresistenten Staphylococcen direkt im klinischen Probenmaterial.

1. Die Gensonden wurden aus der Gensequenz des mec A Gens durch chemische Synthese (Oligonukleotid-Sonden) oder PCR-Klonierung (Polynukleotid-Sonden) hergestellt.

Die bevorzugten Gensonden wurden aus einem Bereich ausgewählt, der

- a) spezifisch für methicillinresistente *S. aureus* und *S. epidermidis* ist
- b) in anderen Penicillin Bindeprotein-Genen nicht vorkommt und
- c) alle methicillinresistenten Staphylococcen mit MHK-Werten zwischen 4 bis 128  $\mu\text{g/ml}$  eindeutig erfaßt.

2. Die genomische DNA von methicillinresistenten Staphylococcen wurde durch an sich bekannte Verfahren, die für Staphylococcus adaptiert wurden, isoliert.
3. Die Applikation von Teilen des mec A Gens wurde durch spezifische Primer aus dem kodierenden und nicht kodierenden Strang des mec A Gens unter gleichzeitiger Markierung des Amplifikationsproduktes mit Digoxigenin-dUTP mit Hilfe bekannter Amplifikationsmethoden, bevorzugt der PCR-DNA-Amplifikationsmethode (EP 200 362) oder der HAS-RNA-Amplifikationsmethode (EP 427 074) durchgeführt.
4. Der Nachweis des spezifischen Amplifikationsproduktes erfolgte durch Hybridisierung des Amplifikationsproduktes mit den obengenannten, biotinylierten Gensonden. Dadurch wird mit einem Nachweis von 10 Keimen eine signifikant höhere Sensitivität erreicht als durch direkten Nachweis des Amplifikationsproduktes im Gel, bei dem maximal  $10^3$  Keime nachgewiesen werden.
5. Der Hybridisierungskomplex wird mit Streptavidin gekoppelten magnetisierbaren Partikeln separiert.
6. Die Auswertung des gebildeten Hybridisierungskomplex als Maß für die Menge oder das Vorhandensein von methicillinresistenten Staphylococcen erfolgt durch einen Chemilumineszenztest mit Antidigoxigenin-Antikörpern die mit alk. Phosphatase gekoppelt sind (PCR) oder durch DNA/RNA-Antikörper, die mit alk. Phosphatase gekoppelt sind (HAS-Amplifikation).

Die Auswertung kann bei Verwendung eines externen mitamplifizierten Staphylococcen-DNA-Standard semiquantitativ zur Ermittlung der Menge an methicillinresistenten Staphylococcen im klinischen Probenmaterial eingesetzt werden.

Die Gensonden-Diagnostik insbesondere in Verbindung mit Amplifikationstechniken ist eine schnelle, spezifische und hochempfindliche Methode, die eine Früherkennung der Erreger auf DNA/RNA Ebene ermöglicht. Die Technik kann direkt ohne in vitro Kultivierung im Untersuchungsmaterial durchgeführt werden. Sie basiert auf der

- DNA/RNA Hybridisierungstechnik, d.h. der spezifischen in vitro Bindung von komplementärer Einzelstrang-Nukleinsäure unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren. Die gebildeten DNA/DNA oder DNA/RNA Doppelstränge werden auch als DNA-Hybride bezeichnet. Zur Detektion der spezifischen DNA oder RNA eines Erregers durch die Hybridisierungsreaktion werden komplementäre sequenzspezifische Gensonden verwendet. Diese Gensonden sind entweder kurze, chemisch synthetisierte Oligonukleotidsonden mit einer Länge von 10 bis 50 Nukleotiden oder DNA/RNA Fragmente von 0,5 bis 10 kb, die durch rekombinante Gentechniken hergestellt wurden.
- 10 Die Gensonden können photochemisch (N. Dattagupta, et al., Biochem. 177, 85, 1989) oder enzymatisch durch nick Translation (Rigby, P.W.J. et al., J. Mol. Biol. 113, 237, 1977) oder Random Primed Techniken (Feinberg und Vogelstein, Anal. Biochem. 132, 6, 1983) mit einer radioaktiven oder nicht radioaktiven Markierung versehen werden. Geeignet sind hierfür Markierungen mit  $^{32}\text{P}$  NTPs oder nicht
- 15 radioaktive Markierungen mit Digoxigenin-dUTP, Biotin-dUTP oder direkte Markierung mit Enzymen wie alk. Phosphatase oder Horseradish Peroxidase.

- Für die spezifische Hybridisierung zwischen der nachzuweisenden Nukleinsäure des Erregers und der erregerspezifischen Gensonde werden die Nukleinsäuren zunächst durch Denaturierung (Hitze oder Alkalibehandlung) in Einzelstränge getrennt und
- 20 dann unter stringenten Bedingungen, die durch Temperatur, Ionenstärke der Puffer und organische Lösungsmittel erreicht werden, ganz spezifisch miteinander hybridisiert. Bei geeigneten Hybridisierungsbedingungen bindet die Gensonde nur an komplementäre Sequenzen der nachzuweisenden DNA oder RNA. Diese Hybridisierungsreaktion kann in verschiedenen Testformaten z.B. als Festphasenhybridisierung an einen Träger wie z.B. Nitrozellulose gekoppelter Target-DNA oder Gensonde oder als Flüssighybridisierung durchgeführt werden. Die Auswertung (Read Out) erfolgt über die Markierung der Gensonde mit einem Reportermolekül wie oben aufgeführt oder wie in dem hier dargestellten Reversed
- 25 Phase Hybridisierungssystem über die Target-DNA, die während der Amplifikation mit Digoxigenin-dUTP markiert wird und die Gensonde, die zur Bindung an magnetisierbare Partikel mit Biotin markiert wird. Der Hybridisierungskomplex aus Target-DNA und markierter Gensonde wird nach Entfernen von nicht hybridisierter DNA über das verwendete Reportermolekül quantitativ bestimmt. Dieser Read Out
- 30

kann direkt erfolgen bei Fluoreszenz-Markierung oder radioaktiver Markierung oder indirekt durch Enzymteste und immunologische Verfahren mit Antikörperkonjugaten, die Enzyme wie die alk. Phosphatase enthalten und dann eine Farbreaktion oder Chemilumineszenz-Reaktion ermöglichen.

- 5 Die Testsensitivität mit dieser Gensonden-Diagnostik liegt im Bereich von  $10^5$  bis  $10^6$  Keimen auf der Basis der Detektion von Einzelgenen. Eine Erhöhung der Testsensitivität kann durch die Kombination mit DNA oder RNA-Amplifikationstechniken wie der PCR (EP 200 362), LCR (EP 320 308), NASBA (EP 329 822), QB (PCT 87/06270) oder HAS-Technik (EP 427 074) erreicht werden. Mit diesen  
10 Techniken kann bis zu einer  $10^9$ -fachen Multiplikation der nachzuweisenden DNA erzielt werden. Durch die Kombination von Amplifikation und Hybridisierung wird so die Detektion von einzelnen DNA-Molekülen möglich.

- Da bei Infektionen im Blut Keimzahlen von  $10^1$ - $10^3$  Keimen/ml auftreten, bietet sich mit dieser Technologie die Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung von  
15 methicillinresistenten Infektionsverläufen.

In der vorliegenden Erfindung werden neue spezifische und besonders sensitive Gensonden für methicillinresistente Staphylococcen beschrieben.

- Die neuen Gensonden wurden aus Genbereichen des mec A Gens entwickelt, die spezifische und besonders starke Hybridisierungssignale für methicillinresistente  
20 Staphylococcen aufweisen und sowohl methicillinresistente Staphylococcus aureus (MRSA) und Staphylococcus epidermidis (MRSE) erfassen, aber kein Signal mit methicillinsensitiven Staphylococcen ergeben. Die Konstruktion von Oligonukleotidsonden und Polynukleotidsonden für methicillinresistente Staphylococcen wird in der Erfindung beschrieben. In GenBank und EMBL Nukleotidsequenz-Datenbanken  
25 wurden keine Homologien zu bekannten Gensonden (Ligozzi, M., et al., Antimicrob. Agents Chemother. 35, 575-578, 1991) (U-Gene Research, WO 9108305) oder Primern für die Amplifikation (EP 0 526 876, EP 0 527 628) gefunden.

- Es wird darüber hinaus ein Verfahren zum Einsatz dieser Gensonden in Hybridisierungstesten beschrieben, bei denen eine spezifische Hybridisierung mit Target-DNA  
30 von methicillinresistenten Staphylococcen erfolgt.

Weiterhin wird in dieser Erfindung die Kombination dieser Hybridisierungsverfahren mit Amplifikationstechniken, insbesondere der Hairpinamplifikationsmethode (EP 427 074), beschrieben, durch die eine sehr starke Verbesserung der Testsensitivität erzielt wird.

- 5 Es wurde auch der Einsatz dieser Gensonden und Testverfahren zum Nachweis von methicillinresistenten Staphylococcen in klinischem Probenmaterial beschrieben. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens ist darüber hinaus die Möglichkeit einer semiquantitativen Bestimmung der Menge an methicillinresistenten Infektionskeimen in dem Probenmaterial.

#### 10 **Auswahl und Synthese von Oligonukleotidsonden**

- Für die Auswahl von geeigneten spezifischen Oligonukleotidsonden wurde die Nukleotidsequenz des mec A Gens von Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis herangezogen (Ryffel et al., Gene 94, 137 (1990) Song et al., FEBS Letters 221, 167 (1987). Ausgewählt wurden solche Sequenzen, die konserviert im
- 15 mec A Gen von MRSA/MRSE vorkommen, aber keine Homologie zu den bekannten PBPs aufweisen. Die bevorzugte Oligonukleotidsonde ist in dem Sequenzprotokoll SEQ ID No 1 beschrieben. Mit dieser Oligonukleotidsonde können Festphasen-Hybridisierungsteste mit z.B. Digoxigenin endmarkierten Sonden oder Flüssighybridisierungsteste mit z.B. Photodigoxigenin markierter genomischer DNA
- 20 und biotinmarkierten Oligonukleotidsonden mit denen dann der Hybridisierungskomplex mit Hilfe von Streptavidin gekoppelten magnetisierbaren Partikeln separiert werden, durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Verfahren ist die relativ geringe Nachweisgrenze von  $10^5$  Erregern. Da im Frühstadium der Infektion weitaus geringere Erregerkonzentrationen vorkommen, reicht dieses Ver-
- 25 fahren für eine Frühdiagnose nicht aus.

In der vorliegenden Erfindung wurde deshalb die beschriebene Gensondentechnik kombiniert mit DNA- und RNA-Amplifikationsmethoden wie z.B. der PCR-Technik (EP 200 362, EP 201 184) und Hairpin-Amplifikationstechnik (EP 427 074).

- 30 Das Verfahren, bei dem zunächst das mec A Gen oder Teile davon aus der genomischen DNA amplifiziert werden und dann anschließend das Amplifikations-

produkt spezifisch mit der Oligonukleotidsonde hybridisiert, hat gegenüber der reinen Amplifikationsdiagnostik folgende Vorteile:

1. Die Amplifikationsprodukte enthalten häufig in Abhängigkeit von den Verfahrensbedingungen wie der Annealingtemperatur, Primer und Enzymkonzentration, Primersequenz und MgCL<sub>2</sub>-Konzentration und verwendeten Polymerase, durch Primer-Mismatching unspezifische Nebenprodukte, die bei Anfärbung der Amplifikationsprodukte im Gel oder bei Fluoreszenz-Markierung während der Amplifikation falsch positive Ergebnisse vorspiegeln.
2. Hinzu kommt die deutlich geringere Testsensitivität bei direkter Auswertung der PCR-Produkte, die bei 10<sup>3</sup> Keimen liegt, während in Kombination mit der Gensondenhybridisierung und einem Chemilumineszenz-Read Out ein Nachweis von 10 Keimen pro ml Probenmaterial problemlos gelingt.

Die chemische Synthese der ausgewählten Oligonukleotidsonde erfolgte nach der Phosphoramiditmethode von S.L. Beaucage und M. Caruthers, Tetrahedron Letters, 22, 1859, 1981.

#### Konstruktion der Polynukleotidsonde

Die Polynukleotidsonde wurde durch PCR-Klonierung mit einem SureClone<sup>TM</sup> Ligation Kit der Firma Pharmacia Biochemicals durchgeführt. Erhalten wurde, kloniert in den pUC18 Vektor, eine Polynukleotidsonde von 467 Nukleotiden mit der Nukleotidsequenz beschrieben im Sequenzprotokoll SEQ ID No 2.

Die 467 bp Sonde wurde aus dem Vektor durch Restriktionsenzymsspaltung, Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert und dann durch Standard-Markierungsmethoden (random prime, 3'Endgruppenmarkierung) mit z.B. Biotin-d-UTP markiert. Alternativ wurde die Sonde direkt durch PCR-Synthese mit Primer 3 und 4 (SEQ IB No 9 und 10) unter gleichzeitigem Einbau von Biotin-d-UTP hergestellt.

Diese Gensonde kann wie die Oligonukleotidsonde direkt zur Hybridisierung von genomischer DNA (Slot Blot Hybridisierung, Reversed Phase Flüssighybridisierung oder amplifizierter mec A DNA) eingesetzt werden.

### **Amplifikation von genomischer MRSA/MRSE DNA**

- 5 Für die Amplifikation des mec A Gens oder Teilen davon wurden verschiedene Primer eingesetzt (z.B. EP 527 628 oder EP 526 876). In Verbindung mit den hier beschriebenen MRSA/MRSE spezifischen Oligo- und Polynukleotidsonden sind die Primer 1 Sequenzprotokoll SEQ ID No 3 und Primer 2 Sequenzprotokoll SEQ ID No 4 besonders gut geeignet zur spezifischen Detektion von methicillin-  
10 resistenten Staphylococcen. Sie ergeben mit der genomischen DNA von methicillin-sensitiven Staphylococcen kein im Agarosegel sichtbares Amplifikationsprodukt. Genomische DNA von methicillinresistenten Staphylococcen dagegen ergibt eine starke Amplifikationsbande, die gut mit der Oligonukleotidsonde oder der Polynukleotidsonde hybridisiert und dadurch sehr gute Testsensitivitäten von < als 10  
15 Keimen/ml Probenmaterial erreicht werden.

- Bei der PCR-Amplifikation kann neben den 4 dNTPs (Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat und Thymidintriphosphat) zusätzlich z.B. Digoxigenin-dUTP in das Amplifikationsprodukt eingebaut werden. Dadurch kann das Amplifikationsprodukt mit einem Antidigoxigenin-Antikörper, der  
20 z.B. alk. Phosphatase gekoppelt enthält über einen Chemilumineszenztest mit AMPPD als Substrat oder einem Farbstofftest mit Brom-Chlor-Indolylphosphat und Nitroblautetrazolium ausgewertet werden.

- Alternativ besteht die Möglichkeit fluoreszenzmarkierte Nukleosidtriphosphate wie z.B. Fluoreszein-dUTP oder Cumarin-dUTPs in das Amplifikationsprodukt einzu-  
25 bauen und das Amplifikationsprodukt mit viel höherer Sensitivität als mit Ethidium-bromidanfärbung zu identifizieren.

- Bei der Hairpin-Amplifikation (EP 427 074) wird z.B. ein T7/T3 Hairpinoligonukleotid verwendet, das zusätzlich zur Hairpinsequenz eine Sequenz entsprechend den Oligonukleotidsequenzen aus der mec A Oligonukleotidsonde enthält  
30 (SEQ ID No 6-8). Mit T7/T3 Polymerase werden dann RNA-Transkripte hergestellt,

die mit z.B. biotinylierten Capture-Gensonden (SEQ ID No 5) hybridisieren und an Streptavidin gecoateten magnetisierten Partikeln aus der Reaktionslösung separiert werden können. Der DNA/RNA Komplex kann dann durch DNA/RNA spezifische Antikörper (EP 339 686) detektiert werden, die mit alk. Phosphatase gekoppelt sind.

## 5 Detektion von MRSA/MRSE

Die MRSA/MRSE können direkt über ihre genomische DNA mit den in der Erfindung beschriebenen Gensonden nachgewiesen werden. Die Auswertung kann quantitativ über Slot Blot Hybridisierung oder Reversed Phase Flüssighybridisierung erfolgen. Allerdings ist die Testsensitivität mit ca.  $10^5$  Zellen/ml Probenmaterial  
10 relativ gering und damit für die Früherkennung von Infektionen mit diesen Erregern nur bedingt geeignet.

Besser geeignet ist die Amplifikation des mec A Gens durch die in der Erfindung beschriebenen Primer, die für verschiedene Read Out Methoden mit Fluoreszenz, Biotin, Digoxigenin oder Enzyme wie alk. Phosphatase oder Horse Radish  
15 Peroxidase markiert werden können.

Eine mögliche Read Out Methode ist die Anfärbung des durch Agarosegelelektrophorese separierten Amplifikationsproduktes mit interkalierenden Agenzien wie Ethidiumbromid. Eine andere Möglichkeit ist der Einbau von fluoreszenzmarkierten Nukleosidtriphosphaten in das DNA- oder RNA-Amplifikationsprodukt.  
20 Hierdurch wird eine deutliche Verbesserung der Testsensitivität erreicht.

Die zuverlässigste und sensitivste Methode, die gleichzeitig eine semiquantitative Auswertung ermöglicht ist die in der Erfindung beschriebene Methode der Hybridisierung der Amplifikationsprodukte mit den beschriebenen MRSA/MRSE spezifischen Gensonden. Diese Methode erlaubt darüber hinaus eine Quantifizierung  
25 der MRSA/MRSE in klinischem Probenmaterial (Figur 1). Beim Einbau von z.B. Digoxigenin-dUTP während der Amplifikation und Verwendung von biotinmarkierten Gensonden läßt sich der Hybridisierungskomplex an Streptavidin gecoateten magnetisierten Partikeln separieren und bei Verwendung von Antidigoxigenin-Antikörpern, die mit alk. Phosphatase gekoppelt sind, mit AMPPD als Substrat über  
30 Chemilumineszenz semiquantitativ auswerten.

**Beispiel 1****Synthese von Oligonukleotidsonden und Starteroligonukleotiden (Primer)**

- Die chemische Synthese der ausgewählten Oligonukleotidsonden und Starteroligonukleotide (Primer) erfolgte nach der Phosphoramiditmethode von S.L. Beaucage und
- 5 M. Caruthers, Tetrahedron Letters, 22, 1859, 1981. Folgende Nukleotidsequenzen wurden synthetisiert:

- Oligonukleotidsonde: SEQ ID No 1  
PCR-Primer 1: SEQ ID No 3  
PCR-Primer 2: SEQ ID No 4
- 10 HAS-Capture-Probe, 5'-biotinyliert: SEQ ID No 5  
T3-Hairpinoligo mit mec A Oligonukleotidsequenz: SEQ ID No 6  
T7-Hairpinoligo mit mec A Oligonukleotidsequenz: SEQ ID No 7  
SP6-Hairpinoligo mit mec A Oligonukleotidsequenz: SEQ ID No 8  
PCR-Primer 3: SEQ ID No 9
- 15 PCR-Primer 4: SEQ ID No 10

Die Oligonukleotidsonde wurde nach der Methode von Bollum, The enzymes Boyer ed, Vol 10, p 145, Academic Press New York, am 3' Ende mit Biotin-dUTP markiert. Die Endgruppenmarkierung wurde nicht radioaktiv mit Digoxigenin-dUTP vorgenommen (Chang, L.M.S., Bollum T.J., J. Biol. Chem. 246, 909, 1971).

- 20 In einem 50 µl Ansatz mit 10 µl Reaktionspuffer (Kaliumkakodylat 1 Mol/l; Tris/HCl 125 mmol/l; Rinderserumalbumin 1,25 mg/ml; pH 6,6; 25°C) 1-2 µg Oligonukleotid, 25 Einheiten Terminale Transferase, CoCl<sub>2</sub> 2,5 mmol/l und 1 µl Biotin-d-UTP (1 mmol/l) werden nach 60 Minuten bei 37°C ca. 50 % 3'Endmarkierung erreicht.

25 **Beispiel 2**

**Konstruktion von Polynukleotidsonden für MRSA/MRSE**

Die Polynukleotidsonde wurde durch PCR-Klonierung mit einem SureClone™ Ligation Kit der Firma Pharmacia Biochemicals erhalten. Für die PCR-Reaktion

- 11 -

- wurden 100 ng genomische DNA von MRSA/MRSE, 200 µmol dNTPs, 1,9 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,2 µmol Primer 3 (SEQIDNO9) und Primer 4 (SEQIDNO10) und PCR-Puffer eingesetzt. Nach einer Initialschmelzung 5 Minuten bei 95°C wurde die DNA pro Zyklus 1 Minute bei 94°C denaturiert und dann 2 Minuten bei 50°C das Primerannealing durchgeführt. Anschließend wurde die Primerextension 2 Minuten bei 72°C durchgeführt nach 40 Zyklen wurde die Reaktion 20 Minuten bei 72°C behandelt und dann sofort die PCR-Klonierung durchgeführt. Dazu wurden die dATP Enden am 3' Ende des PCR-Produktes durch die 3'-5' Exonukleaseaktivität des Klenows Fragmentes entfernt. Die PCR Fragmente wurden dann mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und nach einer Phenol/Chloroform Behandlung und MicroSpin Säulenchromatographie das PCR-Produkt Blunt End ligiert in den mit boviner alkalischer Phosphatase entphosphorilierten pUC 18 Vektor. Anschließend erfolgte die Transformation und Selektion von PCR-Klonen nach Standardmethoden (Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- 15 Die aus den Polylinkersequenzen des Vektors isolierte 467 bp Sonde wurde durch random prime-Standardmethoden mit Biotin-d-UTP markiert. Alternativ wurde die Gensonde direkt durch PCR-Synthese mit Primer 3 und Primer 4 unter gleichzeitigem Einbau von 0,2 µmol Biotin-d-UTP hergestellt und in den Gentesten und Beispiel 6 eingesetzt.

### 20 Beispiel 3

#### **MRSA/MRSE spezifische DNA-Amplifikation mit der PCR**

Die Amplifikation der Target-DNA wurde nach der Polymerase Chain Reaktion (EP 200 362; 201 184) durchgeführt.

- Zur PCR-Reaktion wurden eingesetzt 1-1000 pg genomische DNA von methicillinresistenten Staphylococcen, 2 µmol Primer 1 SEQ ID No 3 und Primer 2 SEQ ID No 4, 2,5 Units Taq-Polymerase von Cetus/Perkin-Elmer sowie jeweils 200 µmol dNTPS in einem Gesamtansatz von 100 µl PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, und 0,01 % Gelatine. Die Amplifikation wurde in einem PCR-Prozessor der Firma Cetus/Perkin-Elmer durchgeführt. Für den Chemilumineszenztest nach Beispiel 6 wurde in der PCR zusätzlich 0,15 µmol Digoxigenin-d-UTP zur Markierung des PCR-Produktes eingesetzt.

- 12 -

- Mit den Ansätzen wurde zunächst eine Initialschmelzung der DNA 2 Minuten, 30 Sekunden bei 94°C durchgeführt, dann pro Zyklus 1 Minute bei 94°C die DNA denaturiert, 1 Minute 30 Sekunden bei 50°C das Primer-Annealing und 1 Minute 30 Sekunden bei 72°C die Primer-Extension durchgeführt. Nach 35 Zyklen wurde
- 5 abschließend eine 10 Minuten-Extension bei 72°C durchgeführt und die Ansätze bei 4°C gekühlt.

#### **Beispiel 4**

##### **MRSA/MRSE spezifische RNA-Amplifikation mit HAS**

- Zur RNA-Amplifikation wurde eine Sandwich-Hybridisierung mit einer
- 10 5'biotinylierten Capture-Sonde (SEQ ID No 5) der genomischen DNA von Staphylococcen und dem 5'phosphorylierten Hairpinoligonukleotid SEQ ID No 6-8 durchgeführt wobei der Hybridisierungskomplex an Streptavidin gecoatete magnetisierbare Partikel gekoppelt war. Nach Ligierung von Capture Sonde und Hairpinoligonukleotid erfolgt die Transkriptionsamplifikation vom T7/T3 Hairpin mit
- 15 Hilfe der entsprechenden RNA Polymerase.

- 500 fmol Capture Oligo wurden mit 500 fmol Hairpinoligo und 10 bis 100 amol Target.-DNA in 50 µl T10E1-Puffer 5 Minuten gekocht. 50 µl Target-Hybridisierungspuffer wurden hinzugegeben und dann 10 Minuten bei 52°C inkubiert. Dann wurden 100 µl Dynal Streptavidin Partikel zugegeben, 10 Minuten
- 20 bei Raumtemperatur inkubiert und dann magnetisch separiert und der Überstand verworfen. Nach 3 x Waschen und Separieren mit Waschpuffer wurden 10 µl Ligase Premix-Puffer zugegeben und 15 Minuten bei 37°C ligiert. Nach 2 x Waschen und Separieren mit 200 µl Waschpuffer wurden 25 ml Transkriptionspuffer (IVT-MIX) mit T7-RNA-Polymerase zugegeben. Nach 2,5 Stunden bei 37°C war die RNA-
- 25 Amplifikation beendet.

T10E1-Puffer 10mM Tris/HCl; pH 8, 1mM EDTA

- 13 -

5	Target Hybridisierungspuffer	10 ml	
	20 x SSC	3 ml	[6 X]
	50 x Denhardt Lösung	0,2 ml	[1 X]
	1 mg/ml Hefe tRNA	1 ml	[100M µg/ml]
	1 mg/ml Salmon sperm DNA (denaturiert)	1 ml	[100 µg/ml]
	Dextran sulphat	1 g	[10 % w/v]

10	Wasch-Puffer	100 ml	
	1M NaPhosphat, pH 7,2	10 ml	[100 mM]
	10 % Tween-20	1 ml	[0,1 %]

15	Ligase Premix	150 µl	
	5X Ligase Puffer (BRL)	30 µl	[1X]
	DEPC-Treated water	90 µl	
	1 U/µl Ligase (BRL)	30 µl	[0,2 U/l]

	IVT Premix	131 µl	[Premix]	[Final]
	H <sub>2</sub> O	23 µl		
	3 mg/ml BSA	6,67 µl	[152 ug/ml]	[50 ug/ml]
	1M Tris, HCl, pH 8	16 µl	[122 mM]	[40 mM]
5	1M MgCl	4 µl	[30 mM]	[10 mM]
	0,75 M DTT	5,33 µl	[30 mM]	[10 mM]
	1M NaCl	4 µl	[30 mM]	[10 mM]
	40 U/µl RNA-Guard	10 µl	[3 U/µl]	[1 U/µl]
	0,1M ATP	2 µl	[1,5 mM]	[0,5 mM]
10	0,1M CTP	2 µl	[1,5 mM]	[0,5 mM]
	0,1M UTP	2 µl	[1,5 mM]	[0,5 mM]
	0,1m GTP	10 µl	[7,5 mM]	[2,5 mM]
	70 U/µl T7 RNA Polymerase	46 µl	[24 U/µl]	[8 U/µl]

### 15 **Beispiel 5**

#### **Direkte Auswertung des Amplifikationsproduktes**

Zur direkten Auswertung des DNA-Amplifikationsproduktes wurden nach der Amplifikation interkalierende Agenzien wie z.B. Ethidiumbromid eingesetzt oder während der Amplifikation Fluoreszenz-Nukleotidtriphosphate wie z.B. Fluoreszein dUTP oder Cumarin dUTP eingebaut. Es können auch Biotin-dUTP oder Digoxigenin-dUTP eingesetzt werden und mit Antikörper gekoppelter alk. Phosphatase ein Farbstoff-Readout durchgeführt werden. Auch können bei geringerer Sensitivität entsprechend markierte Primer verwendet werden.

Die bevorzugte Methode war der Einbau von Cumarin dUTP, weil dabei die beste  
25 Testsensitivität erreicht wurde.

Das Amplifikationsprodukt wurde auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und 30 Minuten bei 70 mA elektrophoretisiert. Die Fluoreszenz-Signale von methicillinsensitiven und methicillinresistenten Staphylococcen wurden unter einem UV-Transilluminator direkt ausgewertet.

5 **Beispiel 6A**

**Chemilumineszenz-Gensondentest von DNA-Amplifikationsprodukten**

Durch die Kombination von geeigneten Target-Amplifikationsmethoden wie PCR (EP 200 362), LCR (EP 320 308), NASBA (EP 329 822), Q $\beta$  (PCT 87/06270) oder HAS (EP 427 074) und der Gensondentechnik wird eine signifikante  
10 Sensitivitätssteigerung gegenüber den herkömmlichen Gensonden-Read Out Methoden erzielt.

Die Flüssighybridisierungsteste wurden als Reversed Phase Teste mit 100 ng 3'-biotinylierten Oligonukleotidsonde und amplifizierter DNA nach Beispiel 3 in einem Volumen von 50  $\mu$ l durchgeführt.

15 Nach 10-minütigem Erhitzen auf 100°C und anschließendem Abkühlen auf 0°C wurden 50  $\mu$ l 2 x Boehringer Hybridisierungsmix zugegeben und 1 Stunde bei 45°C hybridisiert. Die magnetisierbaren Beads wurden mit 1 x Boehringermix vorbehandelt und nach dem Separieren über einen Magneten die Flüssigkeit abpipettiert und der Hybridisierungsansatz zugegeben und 1/2 Stunde bei Raumtemperatur unter  
20 schwacher Bewegung inkubiert. Der gekoppelte Hybridisierungskomplex wurde mit den Beads separiert, die Restflüssigkeit abpipettiert und einmal mit Puffer A (2 x SSC; 0,1 % DS) bei Raumtemperatur, dann mit Puffer B (0,1 SSC; 0,1 % SDS) 2 x bei 45°C gewaschen.

Anschließend wurde die Blocking Reaktion und Antikörper-Reaktion zum Nachweis  
25 der Hybridisierung über Chemilumineszenz durchgeführt. Die mit DNA beladenen Beads wurden 1 x mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,1 M NaCl pH 7,5, 0,3 % Tween 20) behandelt und nach dem Separieren und Abpipettieren des Waschpuffers 400  $\mu$ l Puffer 2 (0,1M Maleinsäure; 0,15M NaCl, pH 7,5; 1 % Blocking Reagenz (Boehringer)) zugegeben. Nach 1/2 Stunde Inkubation bei  
30 Raumtemperatur wurde separiert, abpipettiert und 100  $\mu$ l Antikörperkonjugat-Lösung

- 16 -

(AK 1:10000 in Puffer 2) zugegeben und 1/2 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann separiert, abpipettiert und mit 400 µl Waschpuffer behandelt 2 x 15 Minuten bei schwacher Bewegung. Anschließend wurde separiert und mit 150 µl Puffer 3 (0,1M Tris/HCl Puffer mit 0,1M NaCl und 50 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,5) behandelt. Es wurde wieder separiert und mit 100 µl Detektionslösung mit AMPPD 1:100 in Puffer 3 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dann die Chemilumineszenz im Lumineszenz-Photometer bei 477 nm (Lumacounter von Lumac) gemessen.

Mit diesem Test können DNA-Mengen entsprechend 10<sup>6</sup> bis 10<sup>1</sup> Staphylococcus Keime detektiert werden. Die gleiche Detektionsgrenze von 10 Keimen pro ml Blut wurde auch nach Zugabe von unspezifischer Blut-DNA erreicht. Blut-DNA alleine gibt nur geringe Background-Signale im Hybridisierungstest.

### **Beispiel 6 B**

#### **Chemilumineszenz-Schnelltest**

In Beispiel 6 B wird ein vereinfachtes alternatives Chemilumineszenz-Testverfahren zu Beispiel 6 A beschrieben das bei gleicher Testsensitivität in 1 Stunde durchführbar ist und automatisiert werden kann.

Die Flüssighybridisierungsteste wurden als Reversed Phase Teste mit 100ng 3'-biotinylierter Gensonde und amplifizierter DNA nach Beispiel 3 in einem Volumen von 50µl durchgeführt.

Nach 10 minütigem Erhitzen auf 100° C und anschließendem Abkühlen auf 0° C wurden 50µl 2x Hybridisierungsmix (50ml 20XSSC, 1g Blocking Reagenz(Boehringer), 2 ml 10% iges Lauroylsarcosin, 200µl 20 %iges SDS ad 100 ml bidest H<sub>2</sub>O) zugegeben und 5-10 Minuten bei 37° C hybridisiert (Oligonukleotidsonde). Die magnetischen Beads wurden mit 1x Hybridisierungsmix vorbehandelt und nach dem Separieren über einen Magneten die Flüssigkeit abpipettiert, der Hybridisierungsansatz und 100µl 1x Hybridisierungsmix zugegeben und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur unter schwacher Bewegung inkubiert. Der gekoppelte Hybridisierungskomplex wurde mit den Beads separiert, die Restflüssigkeit abpipettiert und einmal mit Puffer B(0,1 SSC; 0,1% SDS) 1x gewaschen.

Anschließend wurde die Blocking Reaktion und Antikörper-Reaktion zum Nachweis der Hybridisierung über Chemilumineszenz durchgeführt. Die mit DNA beladenen Beads wurden 1x mit 500 µl Puffer 2 (0,1M Maleinsäure; 0,15M NaCl pH 7,5; 1% Blocking Reagenz (Boehringer)) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde separiert, abpipettiert und 250 µl Antikörperkonjugat-Lösung (AK 1:2500 in Puffer 2) zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann separiert, abpipettiert und mit 500 µl Waschpuffer behandelt 2x 30 Sekunden, 1x 2 Minuten bei schwacher Bewegung. Es wurde dann mit 100 µl Detektionslösung mit AMPPD 1:100 in Puffer 3 10 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert, dann die Chemilumineszenz im Lumineszenz-Photometer bei 477 nm (Lumacounter von Lumac) gemessen.

Mit diesem Test können DNA-Mengen entsprechend  $10^6$  bis  $10^1$  Staphylococcus Keime detektiert werden. Die gleiche Detektionsgrenze von 10 Keimen pro ml Blut wurde auch nach Zugabe von unspezifischer Blut-DNA erreicht. Blut-DNA alleine gibt nur geringe Background-Signale im Hybridisierungstest.

### Beispiel 7

#### **Chemilumineszenz-Gensondentest von RNA-Amplifikationsprodukten**

Die MRSA/MRSE spezifischen RNA-Transskripte (ca. 0,5 pmol) wurden mit dem Capture Oligo (4 pmol) und 10 µl 3 x Transkriptionspuffer 2 in einem Gesamtvolumen von 30 µl hybridisiert. Dazu wurde der Ansatz 2 Minuten bei 98°C denaturiert, dann 10 Minuten bei 57°C hybridisiert und dann 70 µl H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Nach Zugabe von 100 µl Dynal Streptavidin Partikel wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, magnetisch separiert und der Überstand verworfen. Dann wurde 3 x mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und separiert. Anschließend wurde 2 x mit 200 µl Antikörper-Bindepuffer gewaschen. Es wurden 250 µl Anti-DNA/RNA-Antikörper (0,05 µg/ml) gekoppelt mit alk. Phosphatase zugegeben und 15 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde 3 x mit 200 µl Antikörper-Bindepuffer gewaschen. Die magnetisierbaren Partikel wurden in 200 µl Antikörper-Bindepuffer resuspendiert und in frischen Teströhrchen mit 0,5 ml AMPPD-Lösung 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie im Beispiel 6 in einem Luminometer.

- 18 -

5	3 x Transcriptionspuffer	10 ml	[3 X]	[Final]
	20 X SSC	3 ml	[6 X]	[2 x]
	1M HEPES, pH 7,4	0,3 ml	[30 mM]	[10 mM]
	0,5 mM EDTA, pH 8,0	60 µl	[3 mM]	[1 mM]
	10 % SDS	0,75 ml	[0,75 % w/v]	[0,25 % w/v]

Waschpuffer	100 ml	
1M NaPhosphat, pH 7,2	10 ml	[100 mM]
10 % Tween-20	1 ml	[0,1 %]

Ab Bindungspuffer [0,1M Tris.HCl, 0,1M NaCl, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween]

10	Anti DNA/RNA:AlkPhos	5 ml	
	21,6 ug/ml Antikörper	11,7 µl	[0,05 µg/ml]
	Ab Bindungspuffer	4,99 ml	

15	Substrat/Enhancer (Tropix, Boston, MA)	10 ml
	AMPPD Substrat	0,17 ml
	Saphire Enhancer	1 ml
	Diethylamine Substrat Puffer, pH 9,5	8,83 ml

**Beispiel 8****Isolierung von Staphylococcen-Nukleinsäure**

- Das mit Staphylococcen infizierte Probenmaterial, z.B. infiziertes Blut, wurde bei 8000 UpM 5 bis 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen.
- 5 Das Sediment (ca. 180 bis 200 µl) wurde mit 50 µl TE mit 15 %iger Saccharose versetzt, 20 µl Lysozym + Lysostaphin (10+ 5 mg/ml in bidest.H<sub>2</sub>O) zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit einem Quiamp-DNA-Kit der Firma Diagen. Nach Zugabe von 25 µl Proteinase K und 235 µl AL Puffer wurde gemischt und 10 Minuten bei 70°C behandelt. Dann in Eis
- 10 abgekühlt und 240 µl 100 %iges Ethanol zugegeben und nach kurzem Mischen auf die Qiagen-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule 1 Minute bei 8000 UpM zentrifugiert, das Eluat verworfen. Es wurde 700 µl Wasch-Puffer aufgetragen und nochmals 1 Minute bei 8000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde nochmals mit der gleichen Menge AW Puffer gewaschen und 1 Minute bei 8000 UpM und 10
- 15 Sekunden bei 14000 UpM zentrifugiert und das Eluat verworfen. Es wurden dann 200 µl bidest H<sub>2</sub>O auf die Säule aufgetragen und 1 Minute bei 8000 UpM zentrifugiert. Das Eluat enthält die für die Amplifikation einsetzbare gereinigte Nukleinsäurelösung.

**Beispiel 9****20 Nachweis von MRSA/MRSE in klinischem Probenmaterial**

- Die MRSA/MRSE DNA wurde aus dem klinischen Probenmaterial nach der in Beispiel 8 beschriebenen Methode isoliert. Das Staphylococcen-DNA-Lysat wurde dann mit Hilfe geeigneter Amplifikationsmethoden wie im Beispiel 5 beschrieben mit MRSA/MRSE spezifischen Oligonukleotid-Primern amplifiziert. Die amplifizierte
- 25 Nukleinsäure wurde dann mit der Oligonukleotidsonde SEQ ID No 1 oder der Polynukleotidsonde SEQ ID No 2 hybridisiert und der unter stringenten Bedingungen sich ausbildende spezifische Hybridisierungskomplex aus amplifizierter Staphylococcen-Nukleinsäure und Gensonden-DNA wurde mit magnetisierbaren Partikeln der Firma Dynal separiert und wie im Beispiel 6 durch Chemilumineszenz-
- 30 Read Out quantitativ bestimmt.

In den mit MRSA/MRSE infizierten Blutlysaten wurden mec A Gen-spezifische Hybridisierungssignale noch in einer Konzentration von  $10^1$  Keimen problemlos nachgewiesen.

**Beispiel 10 - Quantitativer Nachweis von MRSA/MRSE**

5 MRSA/MRSE-Nukleinsäure wurden wie im Beispiel 8 aus klinischem Probenmaterial, z.B. Blut, isoliert. Die Amplifikation wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde auf 25 Zyklen beschränkt um eine gute Korrelation zwischen Zellzahl und Chemilumineszenzsignal in dem klinisch relevanten Bereich von  $10^3$  bis 10 Keimen zu erreichen. Neben den klinischen Proben  
10 wurden Proben mit MRSA/MRSE DNA entsprechend den Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^0$  Zellen in 500 ng Blut-DNA parallel amplifiziert und im Chemilumineszenztest analysiert (Beispiel 6). Die Figur 1 zeigt die Chemilumineszenzsignale von  $10^6$  bis 10 MRSA/MRSE im Blut im Vergleich zu parallel amplifizierten Testproben mit  $10^3$  und  $10^2$  Keimen, die mikrobiologisch nachgewiesen worden waren. Das  
15 Diagramm zeigt, daß die Chemilumineszenzsignale aus dem Zellzahl-DNA-Standard ( $10^3$ - $10^2$ ) sehr gut mit den Chemilumineszenzsignalen der Testproben mit  $10^3$  und  $10^2$  Keimen vergleichen lassen und der Chemilumineszenztest zur Quantifizierung der MRSA/MRSE z.B. im Blut eingesetzt werden kann.

20 **Abbildung 1**

In Abbildung 1 ist ein Chemilumineszenztest zum semiquantitativen Nachweis von MRSA dargestellt. Die Amplifikation wurde wie im Beispiel 3 durchgeführt, die Zyklenzahl dabei auf 25 Zyklen beschränkt um eine gute Korrelation zwischen Zellzahl und Chemilumineszenzsignal in dem klinisch relevanten Bereich von  
25 1000 bis 10 Keimen /ml Probenmaterial zu erreichen.

Das Diagramm zeigt die Chemilumineszenzsignale eines Zellstandards von  $10^6$  bis 10 MRSA in Blut im Vergleich zu parallel mitamplifizierten Testproben mit 1000 und 100 Keimen, die mikrobiologisch nachgewiesen worden waren.

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, daß die Chemilumineszenzsignale von dem Zell-DNA-Standard ( $10^2$ - $10^3$ ) sich sehr gut mit den Chemilumineszenzsignalen der  
30 Testproben mit 1000 und 100 Keimen vergleichen lassen und der Chemilumineszenztest zur semiquantitativen Bestimmung von MRSA z.B. in Blut eingesetzt werden kann.

- 21 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- 5 (A) NAME: Bayer AG  
(B) STRASSE: Bayerwerk  
(C) ORT: Leverkusen  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 51368  
(G) TELEPHON: 0214/3061455  
10 (H) TELEFAX: 0214/303482

(ii) ANMELDETITEL: Spezifische Gensonden und Verfahren zum  
quantitativen Nachweis von methicillin-resistenten  
Staphylococcen

15 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
20 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25  
(EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 25 (A) LÄNGE: 35 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

30 (iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

- 22 -

TATGTATGGC ATGAGTAACG AAGAATATAA TAAAT

35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LÄNGE: 467 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

10 (iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGATTATGG CTCAGGTACT GCTATCCACC CTCAAACAGG TGAATTATTA GCACTTGTA 60  
15 GCACACCTTC ATATGACGTC TATCCATTTA TGTATGGCAT GAGTAACGAA GAATATAATA 120  
AATTAACCGA AGATAAAAAA GAACCTCTGC TCAACAAGTT CCAGATTACA ACTTCACCAG 180  
GTTCAACTCA AAAAATATTA ACAGCAATGA TTGGGTAAA TAACAAAACA TTAGACGATA 240  
AAACAAGTTA TAAAATCGAT GGTAAAGGTT GGCAAAAAGA TAAATCTTGG GGTGGTTACA 300  
ACGTTACAAG ATATGAAGTG GTAAATGGTA ATATCGACTT AAAACAAGCA ATAGAATCAT 360  
20 CAGATAACAT TTTCTTTGCT AGAGTAGCAC TCGAATTAGG CAGTAAGAAA TTTGAAAAAG 420  
GCATGAAAAA ACTAGGTGTT GGTGAAGATA TACCAAGTGA TTATCCA 467

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 25 (A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- 23 -

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

5 TAAAGATGAT GCAGTTAT

18

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGGATAATCA CTTGGTATAT CTTC

24

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

20 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

- 24 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TCCATTTATG TATGGCATGA GTAACG

26

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LÄNGE: 66 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

10 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus/ T3 Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

15 AAGAATATAA TAAATTAACC GTCCCTTTAG TGAGGGTAAA TTTTATTATTT ACCCTCACTA 60

AAGGGA

66

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 20 (A) LÄNGE: 62 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25 (iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus/ T7 Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

- 25 -

AAGAATATAA TAAATTAACC GCTATAGTGA GTCGTATTAT TTTTAAATAC GACTCACTAT 60

AG

62

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LÄNGE: 74 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

10 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus/ SP6 Phage

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

15 AAGAATATAA TAAATTAACC GCTATACTGT CACCTAAATC GTATGTTTTT CATACGATTT 60

AGGTGACACT ATAG

74

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 20 (A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25 (iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATGATTATGG CTCAGGTA

18

- 26 -

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 5           (A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
          (B) ART: Nukleinsäure  
          (C) STRANGFORM: Einzel  
          (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

10          (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Staphylococcus aureus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TATCTTCACC AACACCTAG

**Patentansprüche**

1. Eine Oligonukleotidsonde, die mit DNA oder RNA von methicillinresistenten Staphylococcen hybridisiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz wie im Sequenzprotokoll SEQ ID No 1 enthält oder  
5 mutierte Sequenzen davon oder markierte Sequenzen davon.
2. Eine Polynukleotidsonde, die mit DNA oder RNA von methicillinresistenten Staphylococcen hybridisiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie 467 Basen oder Teile davon enthält und die Nukleotidsequenz wie im Sequenzprotokoll  
10 SEQ ID No 2 oder Teile davon enthält oder mutierte Sequenzen davon oder markierte Sequenzen davon.
3. Starteroligonukleotide (Primer) für die Amplifikation und den spezifischen Nachweis von Teilen des mec A Gens, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz wie im Sequenzprotokoll SEQ ID No 3 und 4 enthalten.
4. Hairpinoligonukleotide für die RNA-Amplifikation und den spezifischen  
15 Nachweis von Teilen des mec A Gens, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotidsequenz wie im Sequenzprotokoll SEQ ID No 6 bis 8 enthalten.
5. Verfahren zum Nachweis von methicillinresistenten Staphylococcen in Probenmaterial, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) Oligonukleotid- oder Polynukleotidsonden nach Anspruch 1 und 2 zur  
20 spezifischen Hybridisierung und Detektion von methicillinresistenter Nukleinsäure von Staphylococcen eingesetzt werden
  - b) Oligo- und Polynukleotidsonden mit Hilfe von bekannten Methoden mit Reportermolekülen markiert werden
  - c) die Nukleinsäure von methicillinresistenten/methicillinsensitiven  
25 Staphylococcen direkt oder bevorzugt nach Amplifikation mit an sich bekannten Verfahren zur Reaktion mit den Sonden eingesetzt wird oder direkt ohne weitere Hybridisierung analysiert wird

- 28 -

- d) der Hybridisierungskomplex über die Markierung der amplifizierten Target-DNA ein direktes Maß für den Nachweis und die Menge an methicillinresistenten Staphylococcen liefert.
- 5 6. Ein Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Oligonukleotidsonden nach Anspruch 1 eingesetzt werden.
7. Ein Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Polynukleotidsonde nach Anspruch 2 verwendet wird.
- 10 8. Ein Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß für die Amplifikation von Teilen des mec A Gens die Primer nach Anspruch 3 eingesetzt werden.
9. Ein Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß für die Amplifikation von Teilen des mec A Gens Hairpinoligonukleotide nach Anspruch 4 eingesetzt werden.
- 15 10. Testkit, enthaltend eine oder mehrere der Oligonukleotide nach Ansprüchen 1 bis 4 sowie Puffer und andere Lösungen zur praktischen Durchführung einer Analyse auf Methicillinresistenz in klinischen Probenmaterial.

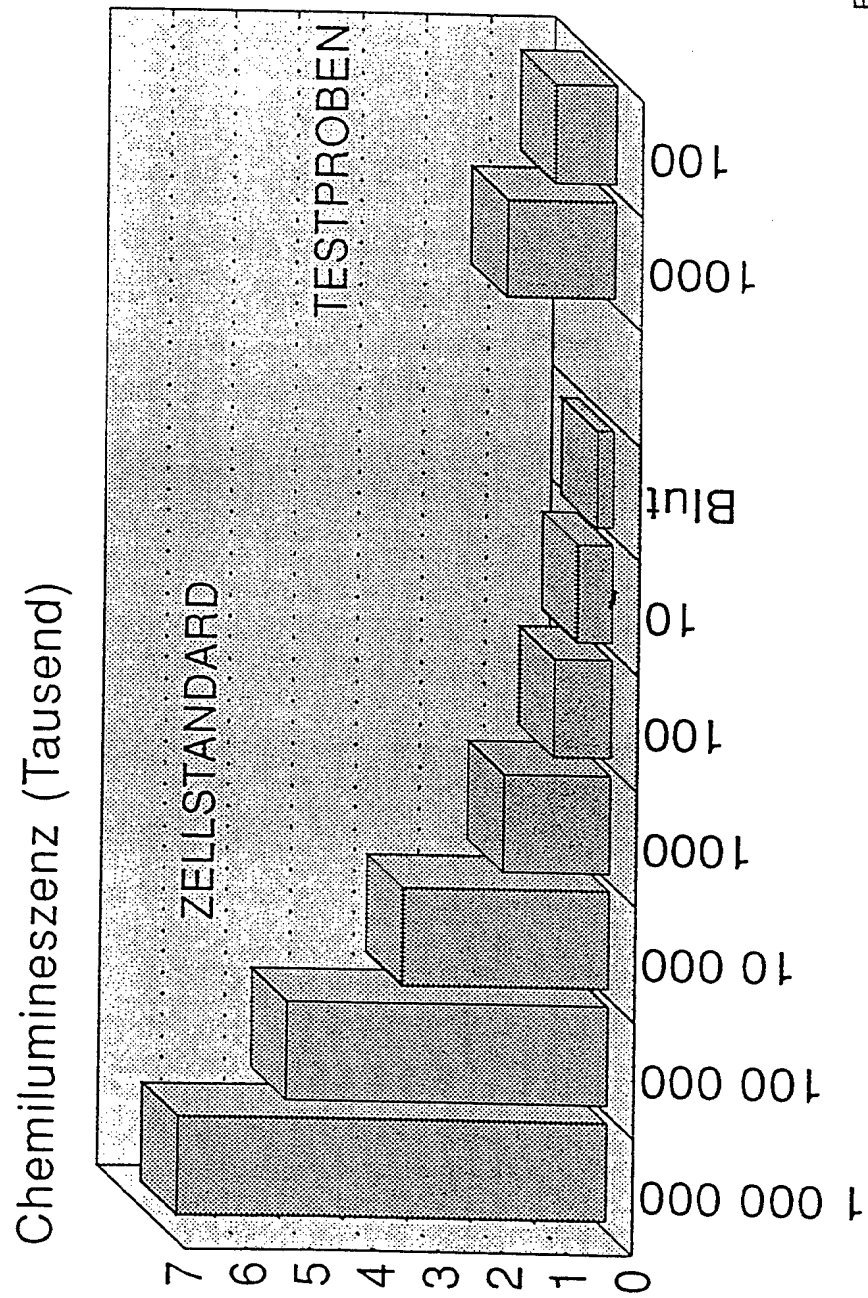


Fig. 1

Staphylococcus Zellen in Blut

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/03553

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol.36, no.5, 1992, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, TOKYO, JAPAN; pages 445 - 453	1,2,5-7, 10
Y	K. HIRAMATSU ET AL. 'Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using polymerase chain reaction' see page 446, line 23 - line 30 see page 451, line 1 - page 452, line 10 --- -/--	3,4,8,9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 1995

Date of mailing of the international search report

27.02.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 94/03553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. CLIN. MICROBIOL., vol.29, no.10, October 1991, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC,US; pages 2240 - 2244 K. MURAKAMI ET AL. 'Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction'	2
Y	see page 2240, right column, line 14 - line 20 see page 2242, right column, line 1 - page 2243, right column, line 15 ---	1,3-10
X	ACTA PATHOL. MICROBIOL. IMMUNOL. SCAND., vol.101, no.9, September 1993, APMIS,COPENHAGEN, DK; pages 681 - 688 O.G. BRAKSTAD ET AL. 'Multiplex polymerase chain reaction for detection of genes for Staphylococci aureus thermonuclease and methicillin resistance and correlation with oxacillin resistance'	2
Y	see page 682, left column, paragraph 3 see page 685, right column, line 1 - page 686, right column, line 35 ---	1,3-10
X	J. CLIN. MICROBIOL., vol.30, no.7, July 1992, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC,US; pages 1685 - 1691 S. UNAL ET AL. 'Detection of methicillin-resistant Staphylococci by using the polymerase chain reaction'	2
Y	see page 1686, left column, paragraph 4 - right column, line 7 ---	1,3-10
X	EP,A,0 527 628 (ELI LILLY AND COMPANY) 17 February 1993 cited in the application	2
Y	see page 2, line 22 - page 4, line 28; claims 1-21; example 3 ---	1,4-10
Y	EP,A,0 526 876 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 10 February 1993 cited in the application see claims 1-7; examples 1-4,6,7; tables 1-3 ---	1,3-10
Y	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 15 May 1991 cited in the application see claims 1-10; examples 1-5 ---	4,10
	--- -/--	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Week 9231, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-253403 & JP,A,4 169 200 (SHIONOGI & CO LTD) 17 June 1992 see abstract ---	1,3-10
A	WO,A,92 05281 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2 April 1992 see page 8, line 5 - page 11, line 15; figure 1 ---	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 5, 31 January 1994, Columbus, Ohio, US; abstract no. 49986m, C. MURAKI ET AL. 'Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using PCR and non-radioactive DNA probes. II' page 533 ;column R ; see abstract & RINSHO BYORI, vol.41, no.10, 1993 pages 1159 - 1166 ---	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 19, 8 November 1993, Columbus, Ohio, US; abstract no. 196746r, T. OSHIMA ET AL. 'Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by in vitro enzymatic amplification of mecA and femA genes' page 204 ;column L ; see abstract & RINSHO BYORI, vol.41, no.7, 1993 pages 773 - 778 ---	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 15, 13 April 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 148093s, K. MURAKAMI ET AL. 'Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction' page 506 ;column L ; see abstract & RINSHO BYORI, vol.39, no.12, 1991 pages 1325 - 1330 ---	1-10
A	EP,A,0 505 151 (ELI LILLY AND COMPANY) 23 September 1992 see page 32, line 15 ---	1-10
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/EP 94/03553

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCIENCE, vol.257, 21 August 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 1064 - 1073 H.C. NEU 'The crisis in antibiotic resistance' cited in the application see the whole document -----</p>	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/03553

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0527628	17-02-93	NONE	
EP-A-0526876	10-02-93	JP-A- 5049477	02-03-93
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922	04-11-93
		AU-A- 6594990	16-05-91
		IL-A- 96250	07-10-94
		JP-A- 4008292	13-01-92
WO-A-9205281	02-04-92	AU-A- 8495291	15-04-92
EP-A-0505151	23-09-92	NONE	

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, Bd.36, Nr.5, 1992, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, TOKYO, JAPAN; Seiten 445 - 453 K. HIRAMATSU ET AL. 'Analysis of borderline-resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using polymerase chain reaction'	1,2,5-7, 10
Y	siehe Seite 446, Zeile 23 - Zeile 30 siehe Seite 451, Zeile 1 - Seite 452, Zeile 10 --- -/--	3,4,8,9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27.02.95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J. CLIN. MICROBIOL., Bd.29, Nr.10, Oktober 1991, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC,US; Seiten 2240 - 2244 K. MURAKAMI ET AL. 'Identification of methicillin-resistant strains of Staphylococci by polymerase chain reaction'	2
Y	siehe Seite 2240, rechte Spalte, Zeile 14 - Zeile 20 siehe Seite 2242, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 2243, rechte Spalte, Zeile 15 ---	1,3-10
X	ACTA PATHOL. MICROBIOL. IMMUNOL. SCAND., Bd.101, Nr.9, September 1993, APMIS,COPENHAGEN, DK; Seiten 681 - 688 O.G. BRAKSTAD ET AL. 'Multiplex polymerase chain reaction for detection of genes for Staphylococci aureus thermonuclease and methicillin resistance and correlation with oxacillin resistance'	2
Y	siehe Seite 682, linke Spalte, Absatz 3 siehe Seite 685, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 686, rechte Spalte, Zeile 35 ---	1,3-10
X	J. CLIN. MICROBIOL., Bd.30, Nr.7, Juli 1992, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, DC,US; Seiten 1685 - 1691 S. ÜNAL ET AL. 'Detection of methicillin-resistant Staphylococci by using the polymerase chain reaction'	2
Y	siehe Seite 1686, linke Spalte, Absatz 4 - rechte Spalte, Zeile 7 ---	1,3-10
X	EP,A,0 527 628 (ELI LILLY AND COMPANY) 17. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt	2
Y	siehe Seite 2, Zeile 22 - Seite 4, Zeile 28; Ansprüche 1-21; Beispiel 3 ---	1,4-10
Y	EP,A,0 526 876 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 10. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-7; Beispiele 1-4,6,7; Tabellen 1-3 ---	1,3-10
Y	EP,A,0 427 074 (MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.) 15. Mai 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-10; Beispiele 1-5 ---	4,10
	--- -/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE WPI  Week 9231,  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 92-253403  &amp; JP,A,4 169 200 (SHIONOGI &amp; CO LTD) 17.  Juni 1992  siehe Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1,3-10
A	<p>WO,A,92 05281 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI  KAISHA) 2. April 1992  siehe Seite 8, Zeile 5 - Seite 11, Zeile  15; Abbildung 1</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 5,  31. Januar 1994, Columbus, Ohio, US;  abstract no. 49986m,  C. MURAKI ET AL. 'Detection of  methicillin-resistant Staphylococcus  aureus using PCR and non-radioactive DNA  probes. II'  Seite 533 ;Spalte R ;  siehe Zusammenfassung  &amp; RINSHO BYORI,  Bd.41, Nr.10, 1993  Seiten 1159 - 1166</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 19,  8. November 1993, Columbus, Ohio, US;  abstract no. 196746r,  T. OSHIMA ET AL. 'Detection of  methicillin-resistant Staphylococcus  aureus by in vitro enzymatic amplification  of mecA and femA genes'  Seite 204 ;Spalte L ;  siehe Zusammenfassung  &amp; RINSHO BYORI,  Bd.41, Nr.7, 1993  Seiten 773 - 778</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 15,  13. April 1992, Columbus, Ohio, US;  abstract no. 148093s,  K. MURAKAMI ET AL. 'Detection of  methicillin-resistant Staphylococcus  aureus by polymerase chain reaction'  Seite 506 ;Spalte L ;  siehe Zusammenfassung  &amp; RINSHO BYORI,  Bd.39, Nr.12, 1991  Seiten 1325 - 1330</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>EP,A,0 505 151 (ELI LILLY AND COMPANY) 23.  September 1992  siehe Seite 32, Zeile 15</p> <p>---</p>	1-10
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCIENCE, Bd.257, 21. August 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 1064 - 1073 H.C. NEU 'The crisis in antibiotic resistance' in der Anmeldung erwähnt insgesamt -----	1-10

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03553

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0527628	17-02-93	KEINE	
EP-A-0526876	10-02-93	JP-A- 5049477	02-03-93
EP-A-0427074	15-05-91	AU-B- 642922	04-11-93
		AU-A- 6594990	16-05-91
		IL-A- 96250	07-10-94
		JP-A- 4008292	13-01-92
WO-A-9205281	02-04-92	AU-A- 8495291	15-04-92
EP-A-0505151	23-09-92	KEINE	